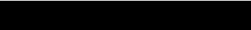
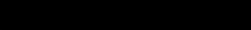
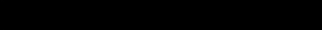
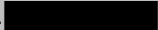
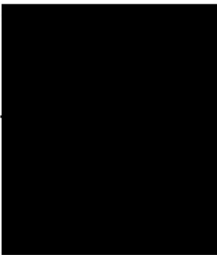
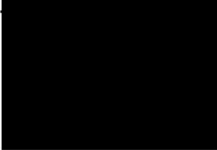
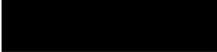
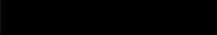


FLI QMH Teil 3/SOP 02	Arbeitsanweisungen	Version 03 Seite 3 von 3
erstellt von:  überarbeitet von: 	freigegeben am: 01.05.2007 geprüft von: 	von: Prof. Dr. Th. 

Friedrich-Loeffler-Institut, Standort Insel Riems	
Real-time RT-PCR zum Nachweis von Influenza A Viren des Subtyps H5 und Pathotyps HP (Methode H5-2344b_DE)	
NRL-AI PCR 40	Version 01

Anlage	1. Protokoll: AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems)	
Erstellt von:	Prof. Dr. 	am: 25.09.2017
Überarbeitet von:	Prof. Dr. 	am: 25.09.2017
Freigegeben durch:	Prof. Dr. 	am: 25.09.2017
..... (Unterschrift)		
ersetzt Version vom: Entfällt		
„QM-geprüft“		(Unterschrift QMB)

Kennntnis genommen:

Name	Dienststellung	Datum, Unterschrift
Prof. Dr. 	Laborleiter	
	Wiss. Angestellte(r)	
	Wiss. Angestellte(r)	
	TA	
	TA	

FLI QMH Teil 3/SOP 02	Arbeitsanweisungen	Version 03 Seite 3 von 3
erstellt von: [REDACTED] überarbeitet von: [REDACTED]	freigegeben am: 01.05.2007 geprüft von: [REDACTED]	von: Prof. Dr. [REDACTED]

1. Einleitung

Die Polymerase-Ketten-Reaktion in Echtzeit (real-time RT-PCR) dient dem Nachweis von Virusgenom in Blut-Gewebe-, Tupfer- oder Organproben. Kleine Fragmente viraler RNA werden in DNA-Fragmente transkribiert, die durch die PCR zu nachweisbaren Mengen amplifiziert werden. Da sich mit diesem Test nur Nukleinsäurematerial des AIV-Hämagglutinin-Subtyp 5, Pathotyp-Hochpathogen (HP) nachweisen lässt, kann die RT-PCR auch einen Positivbefund ergeben, wenn kein replikationsfähiger Infektionserreger mehr vorhanden ist (z.B. in autolytischen Geweben oder Proben von rekonvaleszenten Tieren).

Die beschriebene Methode wird zur weiteren Charakterisierung einer in der M-PCR und H5.1/H5N1-PCR positiv für Influenza A Virus des Subtyps H5 getesteten Probe genutzt. Das vorgestellte H5_2344b_DE-System ist eine Weiterentwicklung der Methode H5-HP des Friedrich-Loeffler-Instituts im Zuge des H5N8-Ausbruchsgeschehens 2016/2017 mit dem Ziel die diagnostische Sensitivität und Spezifität dieser PCR maßgeblich zu erhöhen. Die Methode ist publiziert (Hassan KE, Ahrens AK, Ali A, El-Kady MF, Hafez HM, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. Improved Subtyping of Avian Influenza Viruses Using an RT-qPCR-Based Low Density Array: 'Riems Influenza a Typing Array', Version 2 (RITA-2). *Viruses*. 2022 Feb 17;14(2):415. doi: 10.3390/v14020415).

2. RNA-Extraktion

Der AIV-H5-2344b_DE Assay dient zur weiteren Charakterisierung einer Influenza A (Subtyp H5)-Virusgenom-positiven Probe. Die dafür extrahierte RNA ist bereits durch das in den Voruntersuchungen verwendete heterologe interne Kontrollsystem (IC2) auf Funktionsfähigkeit für nachfolgende charakterisierende Assays validiert worden.

3. Real-time RT-PCR

3.1 Allgemeines

- Die Amplifizierung erfolgt auf Basis des **AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit** (#4387391, Applied Biosystems) in 25 µl Gesamtvolumen.
- Als Kontrollen werden eine „No Template“ Kontrolle (NTC) und mindestens eine positive Kontrolle (PC-H5 (HP) N8-[AR8444/16]) mitgeführt. Als positive Kontrolle sollte eine gering konzentrierte AIV-H5 (HP) N8-RNA eingesetzt werden (TC ca. 30), um das Risiko einer Kreuzkontaminationen durch die positive Kontrolle zu minimieren.
- Nach Herstellung des Mastermix werden je 20 µl vorgelegt und dann 5 µl Template zugefügt.

FLI QMH Teil 3/SOP 02	Arbeitsanweisungen	Version 03 Seite 3 von 3
erstellt von: [REDACTED] überarbeitet von: [REDACTED]	freigegeben am: 01.05.2007 geprüft von: [REDACTED]	von: Prof. Dr. [REDACTED]

3.2 Herstellung des Mastermix

- Die Menge des herzustellenden Mastermixes richtet sich nach der Anzahl der extrahierten Proben plus die Kontrollansätze (PC-H5 (HP) N8; NTC) und einer entsprechenden Reserve.
- Werden für eine absolute Quantifizierung mehrere Standards mitgeführt, muss die Menge des hergestellten Mastermixes entsprechend angeglichen werden.
- Nachdem der Mastermix durch auf- und niederpipettieren gut gemischt wurde, erfolgt die Verteilung von 20 µl in die PCR-Platte.

3.3 Zugabe der Template-RNA

- Zu den vorgelegten 20 µl Mastermix werden 5 µl RNA-Template hinzu pipettiert.
- Neben den extrahierten Feldproben werden eine positive Kontroll-RNA (PC-H5 (HP) N8) und eine „no template control“ (NTC) mitgeführt.
- Nach Zugabe der Template-RNA und Verschluss der PCR-Platten mit adhäsiver Folie erfolgt ein kurzes Abzentrifugieren der PCR-Ansätze.

3.4 Auswertung

FAM-Kanal

- Für die PC/Standards (PC-H5 (HP) N8) muss ein TC-Wert feststellbar sein. Die ermittelten TC-Werte richten sich nach der eingesetzten Genomlast PC-H5 (HP) N8-RNA je Reaktion. In Abhängigkeit vom eingesetzten real-time Gerät und dem verwendeten Threshold kann der TC-Wert schwanken. Ein TC-Wert um 30 ist optimal für eine stabile Amplifizierung und minimiert die Kreuzkontaminationsgefahr.
- Mit der PC/Standards wird die Funktion des AIV-H5-2344b_DE-Genom-Detektionssystems sichergestellt. Ist für die PC/Standards kein TC-Wert feststellbar, ist die RT-PCR mit einem neuen AIV-H5-2344b_DE-Mix-FAM und/oder einer neuen PC (PC-H5 (HP) N8) zu wiederholen.
- Für die NTC ist kein TC-FAM-Wert feststellbar.
- Wenn alle eingesetzten Kontrollen in richtiger Weise reagieren, ist eine Auswertung der Feldproben-Ansätze möglich.

- e) Eine AIV-H5-Verdachtsprobe wird dann als HP-positiv in der RT-PCR gewertet, wenn ein TC-FAM-Wert <40 für die entsprechende Probe festgestellt wird und/oder ein signifikanter Anstieg der FAM-Fluoreszenz über das Basislevel festzustellen ist.

4. Herstellung der Primer-Sonden-Mixe

4.1 AIV-H5-HP-Mix-FAM

Volume	Oligo (100pmol/μl)	Sequence (5` - 3`)
20.0 μl	2344b_H5_F3	ccttgcgactgggctcag
20.0 μl	2344b_H5_R2	atcaaccattccctgcca
5 μl	2344b_DE_Sonde	FAM-AGA AGA AAR AGA GGG CTG TTT GGG GCT-BHQ-1
155 μl	0,1 x TE (pH 8,0)	
200 μl	Primer-probe-mix	

☐ 10 pmol Primer/μl + 2.5 pmol Sonde/μl

Bei der Verwendung neuer Chargen von Primern und insbesondere Sonden ist eine neuerliche Validierung der eingesetzten Primer- und Sondenkonzentration mit der bislang eingesetzten PC erforderlich.